

Tsukada, Tomohiro Uchida, Hiromiti Nakadate, Chikara Oshio and Haruyuki Minamitani
Mechanism of increased platelet aggregation in Diabetes Mellitus -Newly-devised investigation with laser scattering platelet aggregometer-In Microcirculation annual 2002 M.Asano, and C.Ohkubo, eds., Nihon-Igakukan, Tokyo, pp.63-64, 2002, October

12) Haruyuki Minamitani, Kosuke Tsukada, Eiichi Sekizuka, and Chikara Oshio

Measurement of blood flow and oxygen tension using fluorescent and phosphorescent molecular probes in organ microcirculation In Microcirculation annual 2002 M.Asano, and C.Ohkubo, eds., Nihon-Igakukan, Tokyo, pp.13-14, 2002, October

13) Tomomi Uchida, Eiichi Sekizuka, Chikara Oshio, Kosuke Tsukada, Tadashi Ozawa Hiromiti Nakadate and Haruyuki Minamitani

Investigation on the thrombus formation of diabetes mellitus In Microcirculation annual 2002 M.Asano, and C.Ohkubo, eds., Nihon-Igakukan, Tokyo, pp.67-68, 2002, October

14) Mami Ishikawa, Ejichi Sekizuka, Chikara Oshio, Shuzo Sato, Noriyuki Yamaguchi, Satoshi Terao, Kosuke Tsukada, Haruyuki Minamitani, Takeshi Kawase Platelet adhesion and arteriolar dilation in the photothrombosis: observation with the rat closed cranial and spinal windows Journal of the Neurological Sciences 194:59-69, 2002

15) 南谷晴之, 高橋未帆, 長尾朋和, 関塚永一, 今関善晴, 大塩力 血栓形成過程における白血球動態と活性酸素産生 日本バイオレオロジー学会誌 16(1):29-31, 2002

16) 南谷晴之, 川村友美, 塚田孝祐, 飯島淳彦, 関塚永一, 大塩力 原子間力顕微鏡による赤血球弾性の計測 電子情報通信学会論文誌 122-C(9): 1664-1671-7, 2002

17) 山口則之, 小野塚聡, 関塚永一, 赤路和則 糖尿病における脳微小循環障害の特徴と外科的治療 Complication(糖尿病と血管), 特集糖尿病と微小循環, 7(2):68-74, 2002.11

学会発表

1) Koji Miyazaki, Ejichi Sekizuka, Kazuhiko Ooya, Chikara Oshio, Haruyuki Minamitani, Kazuo Suzuki Phagocytic effect of LECT2 on kupffer cells Workshop on Dysfunction of Host-Defence-2002, Hatooji, Tokyo, 2002, November 8-9

ナノプローブとバイオイメーキング技術を用いた微小循環障害の機構解析, 微小循環セミナー第28回日本微小循環学会総会, 2003, 2, 13(東京)

2) 岡崎絵里奈, 塚田孝祐, 中橋浩康, 関塚永一,

大塩力, 南谷晴之, 原子間力顕微鏡による赤血球ゴーストの弾性解析, 第28回日本微小循環学会総会, 2003, 2, 13(東京)

3) 広瀬耕徳, 関塚永一, 大塩力, 小澤正, 中橋浩康, 南谷晴之, 糖尿病患者の血小板凝集能亢進における GP IIb/IIIa の関与

第28回日本微小循環学会総会, 2003, 2, 13(東京)

4) 中橋浩康, 関塚永一, 大塩力, 小澤正, 広瀬耕徳, 南谷晴之, 森下鉄夫, 糖尿病状態化における血管内皮細胞と血小板との相互作用の検討, 第28回日本微小循環学会総会, 2003, 2, 13(東京)

5) 南谷晴之, 塚田孝祐, 関塚永一, 大塩力: マルチフォトニックイメーキングによる組織微小循環の機能解析-酸化ストレスに基づく内皮細胞傷害と血栓形成, 公開シンポジウム「ナノとバイオイメーキングの融合と医用への展開-安全な医薬・治療法へのアプローチ-」, pp34-35, 2004-1(東京)

6) 広瀬耕徳, 中橋浩康, 後関治彦, 南谷晴之, 関塚永一, 大塩力, 泉田太郎, 坂元直行, 霜沢真, 吉川敏一: 散乱光法を用いた糖尿病患者における血小板凝集能亢進の検討, 第29回日本微小循環学会総会, pp69, 2004-2(熊本)

寺尾聡, 関塚永一, 石川真実, 山口則之, 南谷晴之, 河瀬武: 異なる蛍光色素により色分け標識した血小板と白血球の観察-mouse cranial window と 3 CCD カメラ装着生体顕微鏡を用いて-, 第29回日本微小循環学会総会, pp52, 2004-2(熊本)

7) 中橋浩康, 関塚永一, 大塩力, 広瀬耕徳, 後関治彦, 南谷晴之: 糖尿病易血栓性におけるシェアストレスの影響, 第29回日本微小循環学会総会, pp69, 2004-2(熊本)

8) 石川真実, 関塚永一, John H. Zhang, Anil Nanda, Neil Granger: 脳微小循環における血小板と白血球の接着 第29回日本微小循環学会総会, pp52, 2004-2(熊本)

9) 南谷晴之, 塚田孝祐, 関塚永一, 大塩力: 生命情報のセンシング-多波長励起フォトニックイメーキングシステムによる機能解析-, 平成16年電気学会全国大会, ppS14(1)-S14(4), 2004-3(相模原)

10) 南谷晴之, 塚田孝祐, 関塚永一, 大塩力: マルチフォトニックイメーキングによる組織微小循環の機能解析-酸化ストレスに基づく内皮細胞傷害と血栓形成, 公開シンポジウム「ナノとバイオイメーキングの融合と医用への展開-安全な医薬・治療法へのアプローチ-」, pp34-35, 2004-1(東京)

11)宮崎耕司, 関塚永一: 新規好中球郵送サイトカイン LECT2 の劇症肝炎への関連についての研究、厚生労働科学研究費補助金特定疾患対策研究事業 (H13 - 難治-01)

「難治性血管炎に伴う多臓器不全に係る病態の解明および治療法の開発に関する研究」

平成 15 年度総括 OF 班会議, 2004.1.10

12)関塚永一: 糖尿病性血管障害のイメージング診断と治療への応用、厚生労働科学研究費補助金萌芽的先進医療技術推進研究事業(H14-ナノ-018)、超極限分子プローブによる組織障害の再生・治癒機構の解析と高精度局所診断技術の開発、平成 15 年度総括・分担研究報告書 pp37 - 44, 2004.3

13)南谷晴之, 塚田孝祐, 関塚永一, 大塩力: 生命情報のセンシングー多波長励起フォトリックイメージングシステムによる機能解析ー, 日本電気学会誌, 2004-3

14)南谷晴之, 塚田孝祐, 新井達也, 寺尾聡, 関塚永一, 大塩力: マルチフォトリックイメージングシステムによる虚血脳微小循環の血流動態と酸素代謝の計測, 第 43 回日本 ME 学会大会論文集, pp170, 2004-5 (金沢)

15)後閑治彦, 関塚永一, 大塩力, 広瀬耕徳, 南谷晴之: 高血糖血管内皮細胞における活性酸素産生亢進、第 13 回日本バイオイメージング学会.2004.11 月 5~7 日.京都府立医科大学

16) 内田祥太, 関塚永一, 大塩力, 広瀬耕徳, 後閑治彦, 南谷晴之: マルチカラーイメージングを用いた人工微小流路内の血液流動状態の観察、第 13 回日本バイオイメージング学会.2004.11 月 5~7 日.京都府立医科大学

17)高橋亮太, 新井達也, 塚田孝祐, 石川真実, 関塚永一, 大塩力, 南谷晴之: 脳皮質細動脈近傍における血流動態および酸素分圧勾配の計測, 第 13 回日本バイオイメージング学会学術集会要旨集, pp186-187, 2004-11 (京都)

18) 広瀬耕徳, 関塚永一, 大塩力, 泉田太郎, 後閑治彦, 内田祥太, 南谷晴之: 糖尿病患者における血小板凝集能亢進に対する fibrinogen の関与、第 27 回日本血栓止血学会.2004 年 11 月 18~20 日. 奈良県新公会堂

19) 広瀬耕徳, 関塚永一, 穂苅量太, 三浦総一郎, 大塩力, 後閑治彦, 内田祥太, 南谷晴之: 高グルコースおよび静止圧負荷における培養血管内皮細胞障害のメカニズム、第 11 回日本ヘモレオロジー学会.2004 年 11 月 25~26 日. 順天堂大学医学部

20) 後閑治彦, 関塚永一, 大塩力, 広瀬耕徳, 南谷晴之: 高血糖血管内皮細胞における酸化ス

トレス亢進、第 11 回日本ヘモレオロジー学会.2004 年 11 月 25~26 日. 順天堂大学医学部 MC-FAN および LSPA を用いた糖尿病血流動態悪化時の各血球成分別の解析

21)内田祥太, 関塚永一, 大塩力, 広瀬耕徳, 後閑治彦, 林哲也 4, 南谷晴之

第 11 回日本ヘモレオロジー学会.2004 年 11 月 25~26 日. 順天堂大学医学部

22) 荻野陽望, 関塚永一, 石川真実, 寺尾聡, 大塩力, 鈴木奈穂, 南谷晴之: 白血球・血小板のマルチカラーイメージングを用いた糖尿病状態における脳虚血再灌流障害の発生機序の解析、第 11 回日本ヘモレオロジー学会.2004 年 11 月 25~26 日. 順天堂大学医学部

23) 鈴木奈穂, 関塚永一, 石川真実, 寺尾聡, 荻野陽望, 大塩力, 南谷晴之: 脳虚血再灌流時におけるマルチカラーイメージングによる白血球ー血小板動態の同時解析、第 11 回日本ヘモレオロジー学会.2004 年 11 月 25~26 日. 順天堂大学医学部

24) 関塚永一: 厚生労働科学研究費萌芽的先端医療技術推進研究事業ナノメディシン分野「超極限分子プローブによる組織傷害の再生・治癒機構の解析と高精度局所診断技術の開発」研究報告会, ナノメディシン公開シンポジウム「ナノバイオイメージングで切り開く先端的生体機能解析ー血管炎と微小循環血流障害における分子生理機能を解き明かすー」抄録集 糖尿病における血球と微小循環系の障害, 抄録集, pp15, 2004-12 (東京)

25)Hirose Y., Sekizuka E., Nakadate H., Ozawa T., Minamitani H., Oshio C., Ishii H.: Role of oxidative stress in interaction between endothelial cells and platelets in diabetes, Organ Microcirculation A Gateway to Diagnostic and Therapeutic Interventions - , A Supplemental Issue for The 14th Keio University International Symposium for Life Science and Medicine, pp44,52, Supplement 2, Dec.11-13,2003

H. 知的財産権の出願/登録状態
特許申請なし.

細胞組織動態の解析に向けた軟X線顕微鏡技術開発

分担研究者：眞島利和 独立行政法人産業技術総合研究所光技術研究部門 主任研究員
研究協力者：新井孝夫 東京理科大学理工学部応用生物科学科 教授

研究要旨

水分を多量に含むヒアルロン酸（HA）マトリックスを含めた細胞外マトリックス（ECM）のような試料を固定・脱水処理することなく、生理的狀態のまま高分解能観察するためには、従来の電子顕微鏡とは異なる技術手法が必要とされる。炭素イメージングに基づく超高感度バイオイメーjing技術・機器の開発に向けて、密着型フラッシュ軟X線顕微鏡による培養細胞の生理的条件下での高分解能観察に取り組み、電子顕微鏡観察や光学顕微鏡観察ではこれまで分解能的に空白の領域であった水中での高分解能観察（ $\sim 40\text{ nm}$ ）を目的として、HA合成酵素を特異的に発現させたHAS細胞のHAマトリックス観察をおこなった。軟X線顕微鏡観察で得られたHAS細胞のHAマトリックスに関する新たな知見として、細胞のHAマトリックスの存在形態には、1）従来の血球排除法で確認されていた状態のもの他に、2）血球排除法で確認されていたHAマトリックスの領域をこえた細胞周辺のかなり幅広い範囲にわたってHAのネットワークが広がっている状態のものがあることが示唆された。試料の前処理が不要で、生理的狀態のまま高分解能観察ができる軟X線イメージング法は、HAマトリックスとHA結合タンパク質や他のECM成分とのかかわりを生理的条件下で研究するために有効である。

A. 研究目的

血管の炎症や血流障害を引き起こす疾患に付随して血管壁の厚みの増加や血管狭窄などが生じるが、こうした要因の一つは血管壁の結合組織内での細胞外マトリックス（ECM）の増加であることが知られている。特に動脈血管系では、内皮細胞・平滑筋細胞及び血管外膜の線維芽細胞で合成されるヒアルロン酸（HA）が、ECM成分として血管壁での平滑筋の分裂や移動、血管狭窄に密接に関連していることが明らかにされている。

HAは、N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸の2種類の単糖が交互に2糖単位で数百から数千が直線状に結合した高分子である。分子量 $4,000\text{ KD}$ のもので、分子の長さは約 $10\text{ }\mu\text{m}$ である。HAは生体内では、酸の形ではなくポリアニオンとして機能しているため、正確にはヒアルロナンと呼ばれるが、日本語の記述では慣習的にヒアルロン酸と呼ばれることが多い。

HAは、細胞内のヒアルロン酸合成酵素（HAS）により合成され細胞外へ放出される。HAは、生理的な溶液条件下ではランダムコイル状態をとると考えられている。HA分子の占める空間を水分子や電解質・アミノ酸などの低分子は自由に

拡散することができるが、タンパク質分子のような大きな分子はHA分子の占める空間から部分的に排除されるため、拡散速度は遅くなる。このようにECMの構成成分として必須なHAは、細胞と外界とを結ぶインターフェイスとして物質の輸送を制御すると共に、HA結合タンパク質と結合してネットワークを形成し、水を保持する働きをしている。

HAマトリックスを含めたECMのような水分を多量に含む試料を固定・脱水処理をすることなく、そのままの状態での高分解能観察をするためには、従来の電子顕微鏡とは異なる技術手法が必要とされている。本研究では、こうした試料の観察のための超高感度バイオイメーjing技術・機器の開発に向けて、密着型フラッシュ軟X線顕微鏡による培養細胞の生理的条件下での高分解能観察に取り組み、電子顕微鏡や光学顕微鏡観察ではこれまで分解能的に空白の領域となっていた水中での高分解能観察（ $\sim 40\text{ nm}$ ）を目的として、生体の炭素分布密度を画像化できる軟X線イメージング法を培養細胞のHAマトリックス観察に適用した。

B. 研究方法

1. 密着型フラッシュ軟X線顕微鏡

軟X線による生物試料のイメージングの原理は、軟X線と呼ばれる波長の長いX線領域にある炭素と酸素の軟X線吸収端の間の波長領域では炭素の軟X線吸収が酸素の軟X線吸収をほぼ一桁上回っていることに着目して、生体のタンパク質などを構成している炭素に吸収されやすい波長の軟X線を照射し、水の酸素による軟X線吸収の影響によるコントラストの低下を抑えて、水中にある生物試料の炭素密度分布を画像化することである。このため、生体透過性の高い硬X線を用いる非侵襲的な医学診断手法とは異なることに注意しなければならない。

実験に用いた密着型フラッシュ軟X線顕微鏡は、パルス光照射により生成されたレーザープラズマをフラッシュ軟X線源とするもので、X線感光性高分子であるポリメチルメタクリレート (PMMA) 薄膜上に培養液などと共に試料を置き、試料の実物大のX線像をPMMA薄膜に記録する。X線露光後、PMMA薄膜を有機溶媒で現像処理してレリーフ状のX線像を得る。これを原子間力顕微鏡 (AFM) で拡大読み出しをして、拡大X線像を得る。

密着型フラッシュ軟X線顕微鏡では3ナノ秒間でフラッシュ露光を完了させるので、X線露光後数10ナノ秒後から始まる軟X線吸収による試料の熱変性過程に起因する画像のブレの影響を受けないきれいな画像を得ることができる。本法は、試料に対して破壊的ではあるが、培養液中の細胞などの高分解能のX線像を得ることができる利点がある。

軟X線イメージングによる細胞観察における問題点は、光学切片を観察する光学顕微鏡や超薄切片を観察する電子顕微鏡とは異なり、得られるX線像が二次元への投影像であるため、データの解釈が複雑になることである。軟X線像とそれを与えた実体を明確に対応付けることが必要とされるために、蛍光プローブに用いてHAをラベルし試料の光学顕微鏡像と軟X線像との比較をおこなうことにより軟X線像の帰属を決定することを試みた。

2. 3Y1細胞の培養

3Y1細胞のHA合成酵素には、HAS1、HAS2、HAS3の3種類の合成酵素があることが知られている。今回実験に用いた細胞は愛知医科大学分子医学研究所の板野直樹博士から提供していただいたもので、遺伝子操作により特定のHASを選択的に発現させた細胞である。これらの細胞は、細胞の周囲にHAマトリックスを形成

することが、固定赤血球を用いた排除体積法により、光学顕微鏡を用いた観察から知られている。

3Y1細胞の培地：ダルベッコ変性イーグル培地 (DMEM) に、10% FBS、ペニシリンGカリウム100U/ml、0.1mg/ml 硫酸ストレプトマイシンを添加したものをを用いた。またHAS合成酵素を導入したHAS2の培養には、10% FBS-DMEMに0.5mg/ml G418 Sulfateを添加したものをを用いた。

ポリDリジンで表面修飾したPMMAチップ (6mm角のシリコンウエハーの表面にPMMA薄膜を形成したもの) に、HAS2細胞を 5×10^3 個/cm²の密度で蒔き培養した。軟X線顕微鏡観察には2日間培養した細胞を用いた。

密着型フラッシュ軟X線顕微鏡で観察するにあたり、培地中の血清を除去するために、細胞を培養したPMMAチップをPBS (-) 溶液で3回、ディッシュ中で穏やかに洗浄した。

3. HAマトリックスの可視化と血球排除法

細胞を培養したプレートに固定化赤血球を加えカバーガラスをかけて観察すると、細胞周辺のHAマトリックスが発達している領域ではHAマトリックスの部分からは固定化赤血球が排除されるため、細胞体と固定化赤血球の間のHAマトリックスに相当する部分が光学顕微鏡的には空隙として観察される。

C. 研究成果

1. HAS細胞のHAマトリックス形成

PMMAチップ上で培養したHAS細胞の培地をPBSに置換したのち、羊固定赤血球を用いた血球排除法により光学顕微鏡観察すると、HAS細胞の周囲に固定赤血球の侵入できない領域があることが示された。同様に培養されたPMMAチップ上のHAS細胞をHA分解酵素で30分間処理をおこなった試料を血球排除法で観察したところ、HAS細胞の周囲に空隙はほとんど見られず、HA分解酵素処理によりHAマトリックスが取り除かれており、PMMAチップ上での培養においてもHAS細胞の周囲にHAマトリックスが形成されることが判明した。このときHAS細胞からHAマトリックスの培地側の境界までの幅は、およそ10ミクロン程度であった。

2. 軟X線顕微鏡による観察方法の改良

密着型フラッシュ軟X線顕微鏡で培養細胞などを観察する際の課題として、1) 窒化シリコン製のX線窓のたわみによるX線窓内部での水の層の厚さの不均一性に起因する背景ノイズによ

るX線像のコントラスト低下と、2) 培養細胞などPMMAチップ上の試料がX線窓とPMMAチップに挟まれて押しつぶされて変形するため、細胞の形態が自然なものではなくなってしまうこと、などがある。今回の観察ではPMMAチップとX線窓との間に適当なスペーサーを入れることにより、この課題の解決を図った。

3. 軟X線顕微鏡によるHAマトリックス観察とHA分解酵素処理の効果

PMMAチップ上で培養したHAS細胞について、HA分解酵素処理によるHAマトリックス除去をおこなったHAS細胞と未処理のHAS細胞のそれぞれについて、軟X線顕微鏡観察をおこなった。HA分解酵素で処理をしていないHAS細胞の軟X線顕微鏡像の例では、粒子排除法による従来の知見では細胞周囲のHAマトリックスが形成されている領域と考えられている範囲に限らずその外側の部分までもを含めて、1 μ m以下の短い繊維状あるいはこれらの凝集体状の構造物が、炭素密度の高い小さな構造物として散在分布していることが示された(図1)。

HA分解酵素で処理したHAS細胞の軟X線顕微鏡像では、こうした短い繊維状の構造物の数は大きく減少していると共に、凝集体状の構造物のサイズが大きくなっていることが判った。

また、PMMA上で培養したHAS細胞の軟X線像を検討した結果、細胞の周辺とHAマトリックスの境界が定かではないことが判明した。これは同時に、細胞周囲のHAマトリックスとその外側の培地部分との境界が定かではないことをも意味している。軟X線顕微鏡観察においてもHAマトリックス部分を明確に表現するための工夫が必要であることが明らかになった。

このため光学顕微鏡観察で用いた血球排除法によるHA境界の可視化を、軟X線顕微鏡によるHAS細胞のHAマトリックス観察に適用することを試みた。しかしながら、軟X線露光時には試料に添加した赤血球の密度が極端に低下していることが多く、HAS細胞周囲のHAマトリックスの境界を血球排除法で明確に示した軟X線像を得ることは、少数の例を除いて困難であった。いくつか得られた軟X線像では、HAS細胞周囲のHAマトリックス部分と接している赤血球数は少ないものの、HAS細胞の周辺には固定化赤血球が排除されたHAマトリックスとみられる間隙が確認できた。HAS細胞の軟X線像の周囲に観察されたこの間隙をAFMで観察すると、炭素密度は低いことが示された。

D. 考察

1. HAマトリックスの存在様式

細胞の形態や分泌機能などが細胞を培養する基質の違いに影響されることが報告されているが、PMMAチップ上で培養したHAS細胞では細胞の周囲にHAマトリックスが形成されることが、固定化赤血球を用いた粒子排除法により光学顕微鏡で観察できた。

血球排除法を施した試料を密着型フラッシュ軟X線顕微鏡を用いて観察すると、軟X線顕微鏡観察時には細胞周囲の赤血球の数が減少している事例が多かった。この原因は軟X線顕微鏡観察を行うために必要な物理的操作(真空チェンバーからの排気)の影響により窒化シリコン薄膜製のX線窓がたわむためX線窓の下の細胞周囲の溶液が流動し、HAマトリックス周辺にあった赤血球が拡散してしまうためであることが判明した。この点については、装置の基本性能にも係ることでもあり、今後適切な対策を講じる必要がある。

血球排除法を適用したHAS細胞の密着型フラッシュ軟X線顕微鏡像の観察から、細胞周囲に形成されたHAマトリックス部分の炭素密度はさほど高くないことが判明した。HAの生理的条件下での存在量は組織によって異なるが、1ml中に0.5mg~4mg程度と見積もられている。HAS細胞の周辺に存在するHAの量がこの程度であるとすれば、HAマトリックス部分でも水の吸収による背景効果のため、培地部分と比べて際立ったコントラストは付きにくいと考えられる。血球排除法を適用した軟X線顕微鏡観察例からは、HAマトリックスに関してこれまでの光学顕微鏡法により得られている知見と大きく異なる結果は得られなかった。

しかしながら、軟X線顕微鏡によるHAマトリックス観察で興味深いのは、HA分解酵素処理により細胞周囲のHAマトリックスを除去した試料と未処理の試料の軟X線像を比較した結果である。HA分解酵素処理を行わなかったHAS細胞の軟X線像では、1 μ m以下の長さをもつ繊維状の構造物、あるいはそれらの凝集体状の構造物が細胞周囲の広い範囲にわたって分布しているのが見られた。HA分解酵素で処理をおこなった試料ではこれらの構造物の密度は大きく減少していたが、逆にそのサイズは数 μ m程度にまで大きくなっていた。この結果は、HA分解酵素処理によりHAは分解されたが、HAマトリックスに結合しているリンクプロテインやHA以外のECM成分などが、HAが分解された後に凝集し複合体を形成した結果ではないかと考えられる。

E. 結論

PMMA 薄膜上で培養したHAS細胞を試料として、密着型フラッシュ軟X線顕微鏡を用いてHAマトリックス観察をおこなった。軟X線顕微鏡観察による知見から、HAS細胞の周りのHAマトリックスの存在形態として、従来の血球排除法で確認されていた状態に対応するもの他に、細胞周辺のかなり幅広い範囲にわたってHAのネットワークが広がっている場合があることが示唆された。これは、光学顕微鏡や電子顕微鏡では可視化できない水中の試料を炭素イメージング法により高分解能で可視化できる軟X線顕微鏡法の特徴を活かした成果である。HAの存在形態は細胞周期に同期して変化していると考えられるが、HAマトリックスとHA結合タンパク質や他のECM成分を生理条件下で観察するには、軟X線イメージング法は有効である。

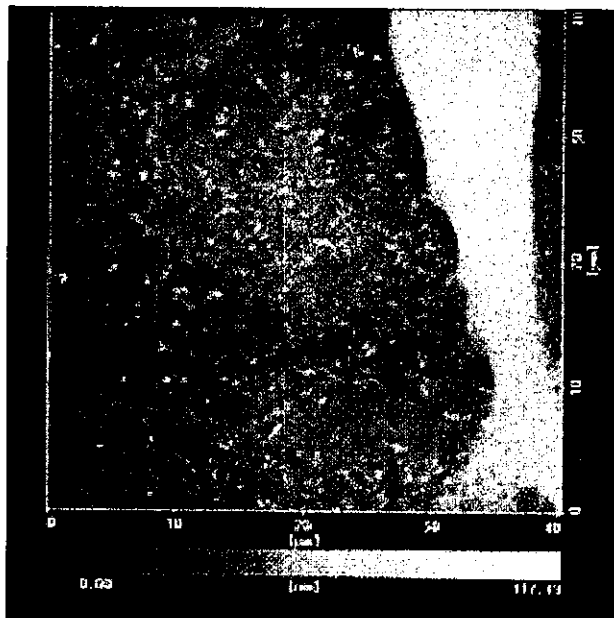


図1. HA分解酵素処理をしていないHAS細胞の軟X線顕微鏡像。HAS細胞周辺部分に細かな構造体が分布している。一辺の長さは40 μ m。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Toshikazu Majima Soft X-ray imaging of living cells in water: flash contact soft X-ray microscope
Trends in Analytical Chemistry, 23, 520-525 (2004)

2. 総説・その他

眞島利和、雨宮邦招

密着型フラッシュ軟X線顕微鏡

RADIOISOTOPES 53, 245-256 (2004)

3. 学会発表

国内学会等発表

密着型フラッシュ軟X線顕微鏡：生きている細胞の炭素イメージング

眞島利和

第30回レーザー顕微鏡研究会シンポジウム

理化学研究所

2004年7月2日

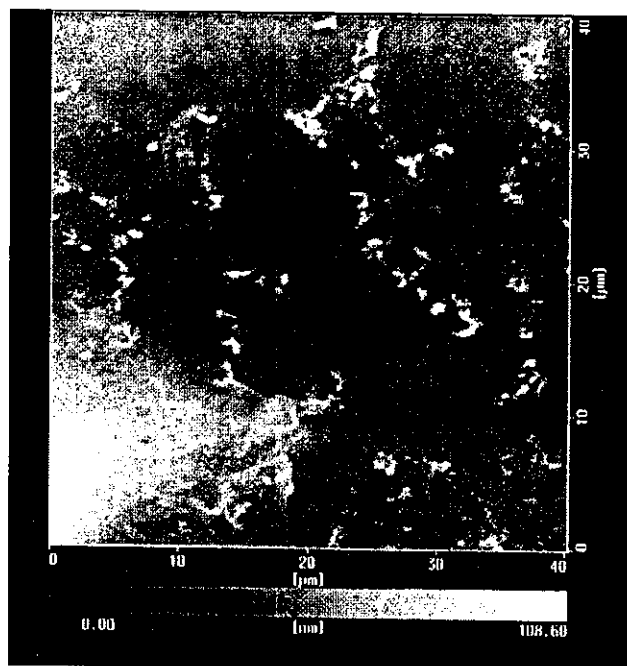


図2. HA分解酵素処理をしたHAS細胞の軟X線顕微鏡像。HAS細胞周辺部分に分布している細かな構造体の数が減少し、サイズは大きくなっている。一辺の長さは40 μ m。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

ナノプローブを用いた単一分子レベルの細胞内生体機能解析と病理診断への応用

研究分担者： 船津 高志 東京大学大学院薬学系研究科 教授

研究要旨：組織障害を高感度に検出する技術の開発は、障害・病態の診断に重要な意味をもつ。このための要素技術として、有機蛍光色素や量子ドットに代表されるナノプローブを用いて生体内分子の機能を1分子レベルでイメージングする技術開発を行った。その具体例として、シャペロニン GroEL によるタンパク質折りたたみ機構の1分子蛍光イメージング解析を行った。

A. 研究目的

体内でさまざまな機能を持って働くタンパク質は、mRNA から翻訳された一本鎖状のポリペプチドが、立体構造を取るにより作られる。シャペロニンは、この立体構造形成（タンパク質の折れたたみ）を助ける、生命維持に必須なタンパク質である。本研究では、ATP 加水分解を伴ったシャペロニンによるタンパク質折れたたみ機構を一分子レベルで解析した。

B. 研究方法

GroEL・GroES の結合解離の可視化

シャペロニン GroEL は、ATP 存在で GroES と結合・解離を繰り返しながら変性したタンパク質の折れたたみを助けている（図1）。

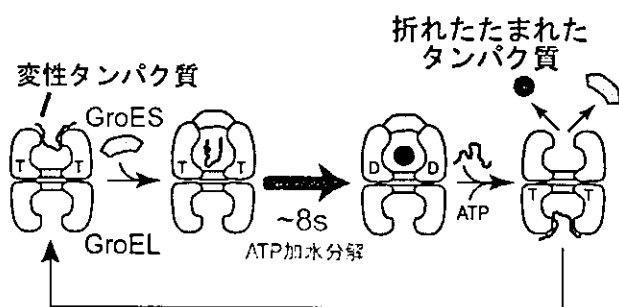


図1. シャペロニンによるタンパク質折れたたみ機構の従来のモデル

この反応サイクルを1分子レベルでイメージングするため、シャペロニンを構成している2個のサブユニット GroEL（たる型）・GroES（ふた型）をそれぞれ異なる蛍光色素で標識した。次に、GroEL をスライドガラス上に固定し、溶液中に GroES と ATP を加えて、一分子蛍光顕微鏡を用いて GroES の結合・解離をイメージングした。
シャペロニンによるタンパク質折れたたみ

シャペロニン反応サイクル中における変性タンパク質の状態に関する情報を得るため、変性状態では蛍光を出さず折れたたむと蛍光を発する GFP（Green Fluorescence Protein）をシャペロニンの基質タンパク質として利用し、シャペロニン内で起こるタンパク質の折れたたみの可視化を試みた。まず、GroEL を酸変性させた GFP と結合させ、スライドガラスに固定した。過剰量の GroES、Caged ATP を入れた溶液中で、紫外線照射により ATP を生成して GroEL に GroES を結合させ、GFP の蛍光が現れる様子を調べた。

C. 研究結果

GroEL・GroES の結合解離の可視化

GroEL をスライドガラス上に固定して、一分子蛍光顕微鏡により GroES との相互作用を調べた。その結果、GroEL に何度も GroES が結合する様

子が観察された (図 2)。GroEL と GroES の相互作用時間の頻度分布を作製したところ、1 段階反応での解離ではなく、途中で未知の中間状態を持つ時定数 3 秒・5 秒の 2 段階反応として、よく Fitting された。これは、シャペロニンが ATP 加水分解以外に数秒の律速反応を持っていることを示している。

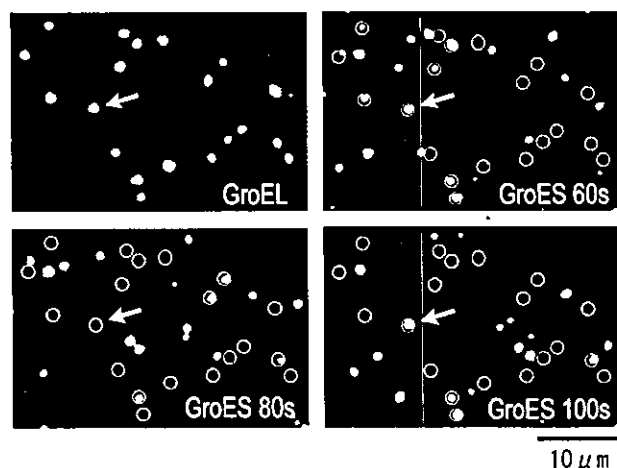


図 2. GroEL-GroES の一分子蛍光像

シャペロニンによるタンパク質折れたたみ

GroEL に酸変性した GFP を結合させ、顕微鏡下で GroES と ATP を加えてシャペロニン反応を開始させた。その結果、1 分子の GroEL 内で起こるタンパク質の折れたたみを GFP の蛍光として、初めて可視化することに成功した。さらにその解析結果から、GroES が GroEL に結合してすぐに GFP が折れたたむのではなく、約 3 秒間の反応を経た後に折れたたみを始めることが分かった。

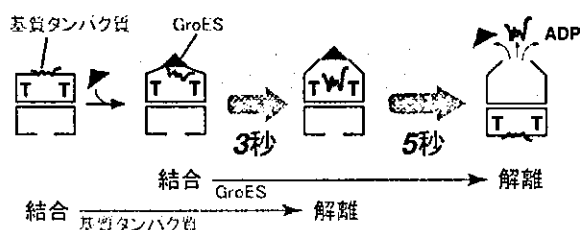


図 3. シャペロニンによるタンパク質折れたたみ機構の新しいモデル

D. 考察

従来のモデルでは、GroES が結合している間、基質タンパク質は常に折れたたむことができると考えられてきた。しかし、今回の知見はサイクル全体の 40% で基質タンパク質の折れたたみが阻害されており、GroEL は GroES を結合してから 3 秒間は、同時に基質タンパク質も結合していることが示唆された。もし GroES 結合と同時に基質タンパク質が GroEL から解離した場合、自由になった基質タンパク質は GroEL の外部に出てしまうおそれがある。しかし、GroEL は、基質タンパク質、GroES と順を追って解離することで、確実に基質タンパク質を閉じ込めるシステムを有しているのである (図 3)。

E. 結論

GroEL と GroES の結合・解離の様子や、GroEL 内部で変性 GFP が折りたたむ様子を 1 分子イメージングすることにより、シャペロニン反応が時定数 3 秒と 5 秒の 2 つの律速過程からなることが明らかになった。前者は変性タンパク質を GroEL 内部へ確実に落とし込むための過程であり、後者は変性タンパク質の巻き戻しに必要な時間を確保するのに使われている。このようにシャペロニンは、変性タンパク質を GroEL 内部に落とし折りたたむための巧妙な機構を有しているのである。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zhang, G.-J., T. Tanii, T. Funatsu, and I. Ohdomari. 2004. Patterning of DNA nanostructures on silicon surface by electron beam lithography of self-assembled monolayer. *Chem Commun.* 786-787.
- 2) Ueno T., H. Taguchi, H. Tadakuma, M. Yoshida and T. Funatsu. 2004. GroEL

- mediates protein folding with a two successive timer mechanism. *Molecular Cell*, 14: 423-434
- 3) Okochi, M., T. Nomura, T. Zako, R. Iizuka, H. Ueda, T. Funatsu, M. Leroux, and M. Yohda. 2004. Kinetics and binding sites for interaction of prefoldin with group II chaperonin: contiguous non-native substrate and chaperonin binding sites in archaeal prefoldin. *J. Biol. Chem.* 279: 31788-31795.
- 4) Tanii, T., T. Hosaka, T. Miyake, G. Zhang, T. Zako, T. Funatsu, and I. Ohdomari 2004. Preferential immobilization of biomolecules on silicon microstructure array by means of electron beam lithography on organosilane self-assembled monolayer resist. *Appl. Surf. Sci.* 234: 102-106
- 5) Zako T., T. Funatsu, and M. Yohda. 2004. Kinetic analysis of interactions between archaeal prefoldin and chaperonin. *Recent Res. Develop. Biophys.* 3: 475-483
- 6) Zhang, G. H. Umezawa, H. Hata, T. Zako, T. Funatsu, I. Ohdomari, and H. Kawarada 2005. Micropatterning oligonucleotides on single crystal diamond surface by photolithography. *Jpn. J. Appl. Phys.* 44: L295-298.
- 7) Nonaka, S., M. Tsunoda, K. Imai, T. Funatsu 2005. High-performance liquid chromatographic assay of N^G -monomethyl-L-arginine, N^G, N^G -dimethyl-L-arginine, and N^G, N^G -dimethyl-L-arginine using 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole as a fluorescent reagent. *J. Chromatogr. A*, 1066: 41-45.
- 8) Hirano, Y., M. Tsunoda, T. Funatsu, and K. Imai 2005. Rapid assay for catechol-O-methyltransferase activity by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, in press.
- ## 2. 学会発表
- 1) Takashi Funatsu 2004年 “Single-Molecule Imaging of Biological Functions” The 53rd Annual convention of the Pharmaceutical Society of Korea. April 22-23. Chungnam National University, Taejeon, Korea.
- 2) 村山研、長尾朋和、鞍馬秀輝、長谷川明洋、船津高志、南谷晴之、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男 2004年 「血管炎における活性化好中球の CD69 分子」 15回日本生体防御学会 7月8日(木)~10日(土) 長崎
- 3) 柳原 直紀、多田隈 尚史、石浜 陽、船津 高志 2004年 「アンチセンス oligoDNA の結合を指標とした GFPmRNA の2次構造解析」 第6回日本 RNA 学会年会 8月4日(水)~6日(金) 熊本テルサ
- 4) 野中聖子、角田誠、青山千頭、船津高志 2004年 「HPLCカラムスイッチングシステムを用いたNOS阻害物質の高感度定量法の開発」 日本分析学会第53年回 9月1日(水)~3日(金) 千葉工業大学芝園キャンパス
- 5) Kohki Okabe, T.Santa, T. Funatsu, and K.Imai. 2004. Study on Fluorescence Properties of Benzofurazans for the Development of Hydrophilic Fluorescent Reagents The Xith International Symposium on Luminescence Spectrometry-Detection Techniques in Biomedical and Environmental Analysis September 18-24 中国北京市清華大学
- 6) Chiaki Aoyama, T.Santa, T. Funatsu, and K. Imai 2004. A fully Automated Amino Acid Analyzer Using NBD-F as A Fluorescent Derivatization Reagent. The XIth International Symposium on Luminescence Spectrometry-Detection

- Techniques in Biomedical and Environmental Analysis September 18-24 中国北京市清華大
- 7) Tatsuoka, M., T. Shimomae, Y. Shirasaki, J. Tanaka, J. Mizuno, T. Edura, K. Tsutusi, Y. Wada, S. Shoji, and T. Funatsu 2004. 2D Free Space Flow Control System using Thermoreversible Gelation of Polymer by IR-Laser. *µTAS 2004 Malmö Sweden*, September 26-30, Malmö Exhibition and Convention Center
- 8) Makoto Tsunoda, T. Funatsu, and K. Imai. 2004. Investigation of Catechol-*O*-Methyltransferase Activities in SHR" Global Conference on Cardiovascular Clinical Trials and Pharmacotherapy September 30-October 4. Hong Kong
- 9) 平野陽子、角田誠、下澤達雄、松井宏光、藤田敏郎、船津高志 2004年「Dahl 食塩感受性ラットにおける COMT 活性の検討」第27回日本高血圧学会総会 10月7日(木)～9日(土) 栃木県総合文化センター
- 10) 山岸舞、村山研、坂本明彦、新井孝夫、鈴木和男、船津高志 2004年「好中球に活性化にとまなうCD69分子の細胞膜表面移行のイメージング」第13回日本バイオイメージング学会学術集会 11月6日(金)～7日(日) 京都府立医科大学 図書館ホール・基礎医学学舎講義室
- 11) 船津高志 2004年「1分子イメージングでタンパク質の機能を探る」第25回日本レーザー医学会総会 11月11日(木)～12日(金) 東京 ホテルオークラ
- 12) 船津高志 2004年「生体分子の1分子検出の研究動向」未踏・ナノデバイステクノロジー第151回委員会第70回研究会 第4回「ナノバイオフュージョン分科会」11月24日(水)早稲田大学
- 13) 東條 正、多田隈尚史、松島綱治、船津高志 2004年「G 蛋白質共役型受容体は恒常的に多量体を形成する: 蛍光一分子イメージングによる解析」第26回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2004年11月25日～26日 東京大学
- 14) 上野太郎、谷井孝至、島本直伸、三宅丈雄、大泊巖、庄子習一、船津高志 2004年「ナノ開口を用いた弱い生体分子間相互作用の1分子検出」日本生物物理学会第42回年回 12月13日(月)～15日(水) 京都 国立京都国際会館
- 15) 三浦貴宏、座古保、上野太郎、船津高志 2004年「シャペロニン GroEL の C 末端欠損変異体の機能解析」日本生物物理学会第42回年回 12月13日(月)～15日(水) 京都 国立京都国際会館
- 16) 岡谷実季、山岸舞、船津高志 2004年「蛍光顕微鏡を用いたアクチンの折りたたみ機構の解析」日本生物物理学会第42回年回 12月13日(月)～15日(水) 京都 国立京都国際会館
- 17) 柳原直紀、多田隈尚史、石浜陽、船津高志 2004年「アンチセンス oligoDNA の結合を指標とした GF-PmRNA の2次構造解析」日本生物物理学会第42回年回 12月13日(月)～15日(水) 京都 国立京都国際会館
- 18) 寺田尚史、多田隈尚史、石浜陽、座古保、船津高志 2004年「蛍光相関分光法を用いた細胞内での GFP の並進拡散運動の解析」日本生物物理学会第42回年回 12月13日(月)～15日(水) 京都 国立京都国際会館
- 19) 永川豊広、鞍馬秀輝、貴家康尋、原田慶恵、船津高志 2004年「*B*-actin mRNA と zipcode-binding protein 1 の結合・解離のキネティクス」日本生物物理学会第42回年回 12月13日(月)～15日(水) 京都 国立京都国際会館
- 20) 山岸舞、村山研、坂本明彦、新井孝夫、鈴木和男、船津高志 2004年「斜光照明蛍光顕微鏡による好中球の CD69分子の細胞膜表面移行のイメージング」日本生物物理学会第42回年回 12月13日(月)～15日(水)

- 京都 国立京都国際会館
- 21) 石浜陽、多田隈尚史、谷時雄、船津高志 2004年「mRNA スプライシング反応の1分子蛍光顕微分光観察」日本生物物理学会第42回年回 12月13日(月)～15日(水) 京都 国立京都国際会館
- 22) 杉野弘和、白崎善隆、和田恭雄、江面知彦、庄子習一、船津高志 2004年「温感性ハイドロゲルを用いたマイクロソーターの改良」日本生物物理学会第42回年回 12月13日(月)～15日(水) 京都 国立京都国際会館
- 23) 白崎善隆、泉俊光、水野潤、庄子習一、和田恭雄、月田承一郎、船津高志 2004年「温感性ハイドロゲルを用いたマイクロソーターの開発」日本生物物理学会第42回年回 12月13日(月)～15日(水) 京都 国立京都国際会館
- 24) 辰岡正康、下前智宏、渡部翔太、白崎善隆、水野潤、庄子習一、和田恭雄、船津高志 2004年「生体物質のマイクロチップ内二次元ハンドリングシステムの開発」日本生物物理学会第42回年回 12月13日(月)～15日(水) 京都 国立京都国際会館
- 25) 船津高志 「単一分子計測とバイオフォトニクス」第146回 有機エレクトロニクス材料研究会 2005年1月18日 東京市ヶ谷 自動車会館
- 26) Hosono K., T. Ueno, H. Taguchi, F. Motojima, T. Zako, M. Yoshida, T. Funatsu. 2005. Conformational changes of GroEL studied by intrinsic tyrosine fluorescence. Biophysical Society 49th Annual Meeting 2005年2月12日(土)～16日(水) Long Beach, CA, USA.
- 27) Zako T., T. Yoshida, Y. Murase, T. Kanzaki, N. Ide, R. Iizuka, T. Funatsu, and M. Yohda. 2005. Interaction analysis between hyperthermophilic chaperonin and prefoldin using SPR sensor. Biophysical Society 49th Annual Meeting 2005年2月12日(土)～16日(水) Long Beach, CA,

USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

炎症反応、関節炎発症における CD69 分子の役割と血栓形成のイメージング

分担研究者：中山俊憲 千葉大学大学院医学研究院 免疫発生学 教授

研究要旨

CD69 分子は活性化したリンパ球の T 細胞や B 細胞の細胞表面に現れる分子で、早期活性化マーカーとしてリンパ球の活性化の指標として広く用いられている。胸腺内で分化途中のセレクションを受けている T 細胞にも発現が見られる(Nakayama et al. *J. Immunol.* 168:87, 2002)。CD69 は、c-type lectin family に属する II 型の膜分子で、45Kd の糖蛋白であるが、通常ホモダイマーとして存在している。コレセプターとして抗原レセプターからのシグナル伝達を増強する機能が推測されているが、詳細は不明である。リガンドは同定されていない。血小板には恒常的に発現している。CD69 ノックアウトマウスを樹立し、関節炎モデル及び血小板血栓形成のイメージングシステムを用いて研究を行った。また、気道炎症発症における CD69 分子の役割を明らかにすることを目的とした。

A. 研究目的

CD69 分子は、c-type lectin family に属する II 型の膜分子で、45kd の膜蛋白であるが、通常はホモダイマーとして存在している（図 1）。T 細胞や B 細胞を刺激すると数時間以内に発現が上昇し、早期活性化マーカー分子としてリンパ球の活性化の指標として広く用いられている。また胸腺内で分化途中のセレクションを受けている T 細胞にも発現がみられる。コレセプターとして抗原レセプターからのシグナル伝達を増強する機能が推測されているが、詳細は不明である。リガンドは現在までのところ、同定されていない。一方、血小板には恒常的に発現しており、活性化した好中球や好酸球などにも発現がみられることから、血小板の機能発現や局所の炎症

反応における役割が推測されている。

そこで本年度は、昨年度から継続している樹立した CD69-KO マウスを用いた、生体内での CD69 分子の役割の解析をさらに進めることを目的にした。また、局所炎症反応における役割を調べるために、抗タイプ II コラーゲン抗体と LPS で誘導される関節炎モデルを用いて、CD69-KO マウスでの発症の程度を検討した。また、マウスでの喘息モデルとして卵白アルブミン (OVA) を用いた気道炎症モデルがある。この OVA で誘導される喘息モデルを用いた解析を行った。

B. 研究方法

1) 関節炎の誘導

8 週齢のメスの CD69-KO マウスおよび wild type の BALB/c マウスに抗タイプ II コラーゲンモノクローナル抗体カクテル 2mg を静注し、2 日後に LPS 0.5mg を腹腔内投与して関節炎を誘導した。抗体投与 6 日後に関節炎の発症の程度を観察した。関節炎の発症の評価は、各マウス四肢の関節部位について、炎症に伴うはれの程度を 0-3 の 4 段階で評価し、その合計を clinical score とした。

2) 組織標本の作製と観察

関節部位を切り取り、4%paraformaldehyde/PBS で固定した後、10%EDTA で処理し、エタノール、プロパノール、キシレンを用いて水分を除いた後、パラフィン中に包埋した。これを薄切して組織標本を作製し、hematoxylin/eosin(H&E)染色を行った後、光学顕微鏡で組織像を観察した。

3) In situ hybridization

マウスの膝関節パラフィンブロックを 4 μ m の厚さで薄切し、切片を作製した。ジゴキシゲニン標識 CD69RNA プローブを in vitro transcription 法により作製し、in situ hybridization 染色を行った。発色基質には NTB/BCIP を使用し、染色後ケルネヒトロートにより核染色を行った。

4) CD69-KO マウスへの細胞移入実験

4-1) T 細胞の調製と投与

wild type BALB/c マウスの脾臓より CD4 陽性 T 細胞をソーティングにより精製し、 1×10^8 個の細胞を day-1 に CD69-KO マウスに静注した後、抗タイプ II コラーゲン抗体および LPS を投与して関節炎を誘導した。

4-2) 脾臓細胞の調製と投与

赤血球を除去した BALB/c マウスの脾臓細胞

1×10^8 個を day-1 に CD69-KO マウスに静注した後、抗タイプ II コラーゲン抗体および LPS を投与して関節炎を誘導した。

4-3) 好中球の調製と投与

BALB/c マウスに 4%thioglycolate 2 ml を腹腔内投与し、4 時間後に生理食塩水で腹腔内洗浄することにより好中球を回収した。この方法により得られた細胞を好中球のマーカー分子である Gr-1 に対する抗体で染色してフローサイトメーターで確認したところ、80%以上の細胞が好中球であった。得られた好中球を 5×10^6 個ずつ day0 および day2 に CD69-KO マウスに静注し、抗タイプ II コラーゲン抗体および LPS を投与して関節炎を誘導した。

5) OVA 誘導性の気道炎症モデルでの検討

マウスでの喘息モデルとして卵白アルブミン (OVA) を用いた気道炎症モデルがある。これは、OVA-alum で免疫後、OVA を吸入させて気道炎症を起こすものである。OVA 特異的 Th2 細胞の分化・誘導が必須で、気管支周囲や血管周囲に好酸球性の浸潤を特徴とする。メタコリンなどによる気道収縮を起こしたときに非常に強く反応する (気道過敏症) ことで機能的な評価も可能であり、喘息のマウス実験モデルとして使用されている。OVA を BALB/c 及び CD69 ノックアウトマウスに投与し、喘息モデルを用いて CD69 の役割を検討した。

C. 研究結果

1) 関節炎の発症における CD69 分子の役割

1-1) 抗タイプ II コラーゲン抗体投与による関節炎の発症

関節炎の発症における CD69 分子の役割を解析するために、CD69-KO マウスと wild type の

BALB/c マウスに対して抗タイプII コラーゲン抗体と LPS を投与し、関節炎を誘導して比較をおこなった。その結果、CD69-KO マウスでは関節炎の発症が有意に抑制されていた。関節部位の組織標本を作製し、病理組織を観察したところ、wild type マウスでは滑膜への顕著な炎症細胞の浸潤がみられ、滑膜、軟骨、骨組織が破壊されていた。浸潤していた細胞の 95%以上は好中球で、マクロファージもわずかに観察された。一方、CD69-KO マウスでは関節部位への好中球の浸潤はごくわずかで、目立った組織の破壊はみられなかった。

1-2) 関節部位へ浸潤した好中球での CD69 分子の発現上昇

抗タイプII コラーゲン抗体投与により関節炎を発症した wild type のマウスでは、関節部位への好中球の目立った浸潤がみられたことから、次にこの浸潤した好中球での CD69 の発現の有無を検討した。標識した CD69RNA プローブを用いて in situ hybridization 染色を行い、CD69mRNA の発現レベルを調べたところ、浸潤した好中球では高い発現が認められた。それに対し、抗体を投与していないマウスの滑膜組織では CD69mRNA の発現は見られなかった。

1-3) CD69-KO マウスへの好中球移入実験

関節炎の発症における好中球上の CD69 分子の重要性を検討するために、wild type マウスの好中球を CD69-KO マウスに静注移入し、抗タイプII コラーゲン抗体および LPS を用いて関節炎を誘導した。その結果、好中球を移入した CD69-KO マウスでは、wild type マウスと同程度に関節炎が誘導され、好中球を移入しなかった CD69-KO マウスに比べ、有意に clinical score が上昇した (図 2)。一方、好中球の代わりに T 細胞や T 細胞・B 細胞を含む脾臓細胞を移入した

場合には、有意な変化はみられなかった。これらの結果から、関節炎の発症において好中球上の CD69 分子が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

2) OVA 誘導性の気道炎症モデルでの CD69 分子の役割

CD69 ノックアウトマウスを用いて OVA によって誘導される好酸球性の気道炎症に関する実験を行ったところ、気管支周囲の好酸球浸潤の増強、PAS 染色による粘液産生の上昇、メタコリン誘導性の気道抵抗値の過敏性上昇を認めた。肺胞洗浄液 (BALF) 中の好酸球浸潤を正常マウス (wt/wt) と CD69 ノックアウトマウス間で比較した。Day0 と day7 で OVA を alum と一緒に腹腔に注射して OVA 特異的 T(Th2)細胞分化を誘導する。Day14 に OVA を吸入 (Inhalation) させ、肺胞洗浄液を day16 に回収した。気道抵抗の実験 (AHR: airway hyperreactivity) では、day19, 20, 21 に吸入を行い、day22 に計測を行った。OVA による気道炎症のプロトコールに関しては数多くのものが報告され、反応性はマウスの background に大きく左右される。CD69 ノックアウトマウスは BALB/c background であるが、私たちはいろいろな条件を検討した後、このプロトコールを決定した。肺胞洗浄液 (BALF) 中の浸潤細胞のなかの好酸球の割合、絶対数ともに CD69 ノックアウトマウスでは減少していることがわかった (図 3)。メタコリン誘導性の気道抵抗の上昇に関しても、10mg/ml, 30mg/ml 両方の dose で有意な低下が観察された。HE 染色と PAS 染色で、組織学的にも確認した。PAS 染色で見た場合、アジュバントの alum のみの免疫ではほとんど気道の上皮細胞に粘液の染色 (紫色) は見られない。OVA と alum を免疫した正常マウスと

CD69 ノックアウトマウスで比べてみると明らかに CD69 ノックアウトマウスで染色の強度が低かった。

D. 考察

1) 関節炎の発症における CD69 分子の役割

CD69-KO マウスでは、抗タイプIIコラーゲン抗体誘導性の関節炎モデルにおいて、その発症が有意に抑えられたことから、関節炎の発症に CD69 が関与することが明らかとなった。CD69 は活性化した T 細胞や B 細胞に高発現されるが、抗タイプIIコラーゲン抗体と LPS で誘導される関節炎は、T 細胞や B 細胞の活性化に依存しない系と考えられており、他の細胞上に発現された CD69 分子が関節炎の発症に関わっていると考えられた。さらに wild type の細胞を CD69-KO マウスに移入して関節炎を誘導した実験では、T 細胞や脾臓細胞を移入した場合には有意な変化は認められなかったが、好中球を移入した場合には CD69-KO マウスでも wild type と同程度に関節炎を発症した。したがって、関節炎の発症には CD69 分子に依存した好中球の役割が重要であることが明らかとなった。関節炎の発症において好中球上の CD69 分子が果たす役割については、2つの可能性が考えられる。1 つは、CD69 が c-type lectin family に属する糖蛋白で、接着分子としての役割が示唆されていることから、好中球が抗体の結合したコラーゲン部位へ接着するのに重要な役割を果たしているという可能性である。またもう 1 つの可能性として、CD69 がコレセプターとして T 細胞の細胞応答に関与するという報告があることから、好中球が関節部位において活性化するのに CD69 を介したシグナルが必要であるという可能性が考えられる。関節炎の発症における CD69 分子の役

割については、そのリガンド分子の発見も含め、さらなる研究が望まれる。

2) 気道炎症発症における CD69 分子の役割

CD69-KO マウスでは、OVA 誘導性の喘息が低い程度にしか起こらず、発症機構に CD69 分子が重要なやくわりをしていることが明らかになった。また、T 細胞の移入により喘息反応が再現できることから、T 細胞上の CD69 分子が重要であることが判明した。また、抗 CD69 抗体の投与によっても喘息反応が抑制できることが明らかになった。従って CD69 分子を標的にした気道炎症のまったく新しい治療法の開発が可能になるかもしれない。

E. 結論

本年度の研究により、関節炎の発症における CD69 分子の関与が明らかとなり、特に浸潤している好中球での役割が示唆された。将来的に CD69 の作用を制御することにより、慢性関節リウマチなどの関節炎を治療できる可能性がある。また、気道炎症モデルでの実験により T 細胞上の CD69 分子の関与が明らかになり、CD69 分子を標的にした喘息の新しい治療法の開発に可能性が出てきた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

1. Koike, J., Wakao, H., Ishizuka, Y., Sato, T., Hamaoki, M., Seino, K., Koseki, H., Nakayama, T., and Taniguchi, M.: Bone marrow allograft rejection mediated by a novel murine NK receptor,

- NKG2I. *J. Exp. Med.* 199:137-143 (2004).
2. Watanabe, H., Shimizu, T., Nishihara, J., Abe, R., Nakayama, T., Taniguchi, M., Sabe, H., Ishibashi, T., and Shimizu, H.: Ultraviolet A-induced production of matrix metalloproteinase-1 is mediated by macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human dermal fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 279:1676-1683 (2004).
 3. Hasegawa, A., Cheng, X., Kajino, K., Berezov, A., Murata, K., Nakayama, T., Yagita, H., Murali, R., and Greene, M. I.: Fas-disabling small exocyclic peptide mimetics limit apoptosis by an unexpected mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:6599-6604 (2004).
 4. Kobayashi, S., Kaneko, Y., Seino, K., Yamada, Y., Motohashi, S., Koike, J., Sugaya, K., Kuriyama, T., Asano, S., Tsuda, T., Wakao, H., Harada, M., Kojo, S., Nakayama, T., and Taniguchi, M.: Impaired IFN- γ production of V α 24 NKT cells in non-remitting sarcoidosis. *Int. Immunol.* 16:215-222 (2004).
 5. Harada, M., Seino, K., Wakao, H., Sakata, S., Ishizuka, Y., Ito, T., Kojo, S., Nakayama, T., and Taniguchi, M.: Down-regulation of the invariant V α 14 antigen receptor in NKT cells upon activation. *Int. Immunol.* 16:241-247 (2004).
 6. Hiroshima, K., Iyoda, A., Shibuya, K., Haga, Y., Toyozaki, T., Iizasa, T., Nakayama, T., Fujisawa, T., and Ohwada, H.: Genetic alterations in an early-stage pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. *Cancer* 100:1190-1198 (2004).
 7. Kondo, N., Ishii, Y., Son, A., Sakakura-Nishiyama, J., Kwon, Y.-W., Tanito, M., Nishinaka, Y., Matsuo, Y., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Yodoi, J.: Cysteine-dependent immune regulation by TRX and MIF/GIF family proteins. *Immunol. Letters* 92:143-147 (2004).
 8. Inami, M., Yamashita, M., Tenda, Y., Hasegawa, A., Kimura, M., Hashimoto, K., Seki, N., Taniguchi, M., and Nakayama, T.: CD28 costimulation controls histone hyperacetylation of the IL-5 gene locus in developing Th2 cells. *J. Biol. Chem.* 279:23123-23133 (2004).
 9. Yamashita, M., Ukai-Tadenuma, M., Miyamoto, T., Sugaya, K., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Kimura, M., Taniguchi, M., DeGregori, J., and Nakayama, T.: Essential role of GATA3 for the maintenance of Type 2 helper T (Th2) cytokine production and chromatin remodeling at the Th2 cytokine gene loci. *J. Biol. Chem.* 279:26983-26990 (2004).
 10. Shimizu, E., Koike, J., Wakao, H., Seino, K., Koseki, H., Kakiuchi, T., Nakayama, T., and Taniguchi, M.: Role of a NK receptor, KLRE-1, in bone marrow allograft rejection: analysis with KLRE-1 deficient mice. *Blood* 104:781-783 (2004).
 11. Yamashita, M., Shinnakasu, R., Nigo, Y., Kimura, M., Hasegawa, A., Taniguchi, M., and Nakayama, T.: Interleukin (IL)-4-independent maintenance of

- histone modification of the IL-4 gene loci in memory Th2 cells. *J. Biol. Chem.* 279:39454-39464 (2004).
12. Nakai, Y., Iwabuchi, K., Fujii, S., Ishimori, N., Dashtsoodol, N., Watano, K., Mishima, T., Iwabuchi, C., Tanaka, S., Bezbradica, J. S., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., Miyake, S., Yamamura, T., Kitabatake, A., Joyce, S., Van Kaer, L., and Onoe, K.: Natural killer T cells accelerate atherogenesis in mice. Short title: NKT cells and atherosclerosis in mice. *Blood* 104:2051-2059 (2004).
13. Diao, H., Kon, S., Iwabuchi, K., Kimura, C., Morimoto, J., Ito, D., Segawa, T., Maeda, M., Hamuro, J., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., Yagita, H., Van Kaer, L., Onoe, K., Denhardt, D., Rittling, S., and Uede, T.: Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. *Immunity* 21:539-550 (2004).
14. Katsumoto, T., Kimura, M., Yamashita, M., Hosokawa, H., Hashimoto, K., Hasegawa, A., Omori, M., Miyamoto, T., Taniguchi, M., and **Nakayama, T.**: STAT6-dependent differentiation and production of IL-5 and IL-13 in murine NK2 cells. *J. Immunol.* 173:4967-4975 (2004).
15. Kimura, M., Hosokawa, H., Yamashita, M., Watarai, H., Hasegawa, A., Iwamura, C., Taniguchi, M., Takagi, T., Ishii, S., and **Nakayama, T.**: Regulation of Th2 cell differentiation by murine Schnurri-2. *J. Exp. Med.* *in press* (2005).
16. Ishikawa, A., Motohashi, S., Ishikawa, E., Fuchida, H., Higashino, K., Otsuji, M., Iizasa, T., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., and Fujisawa, T.: A phase I study α -galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin. Can. Res. in press* (2005).
- H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし

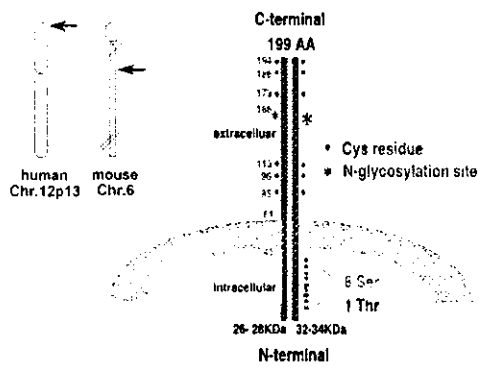


図1 CD69の分子構造

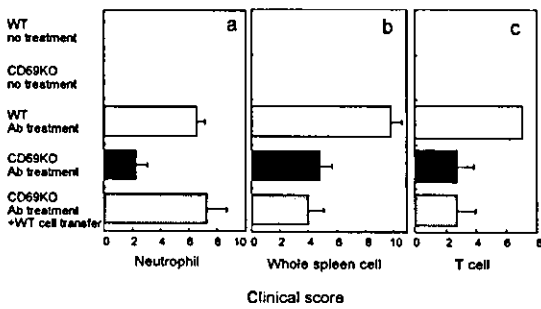


図2 wild type マウスの細胞を移入した場合の関節炎の発症

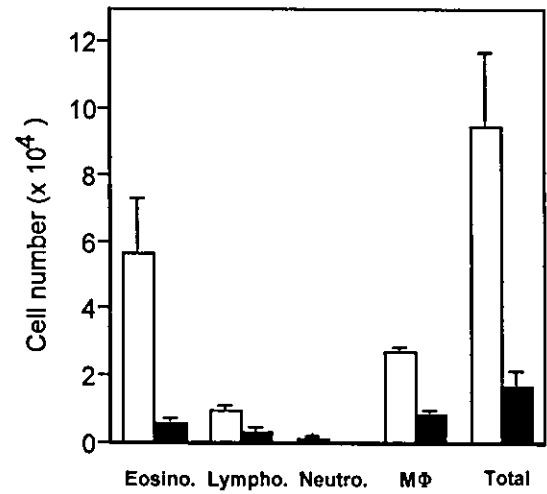
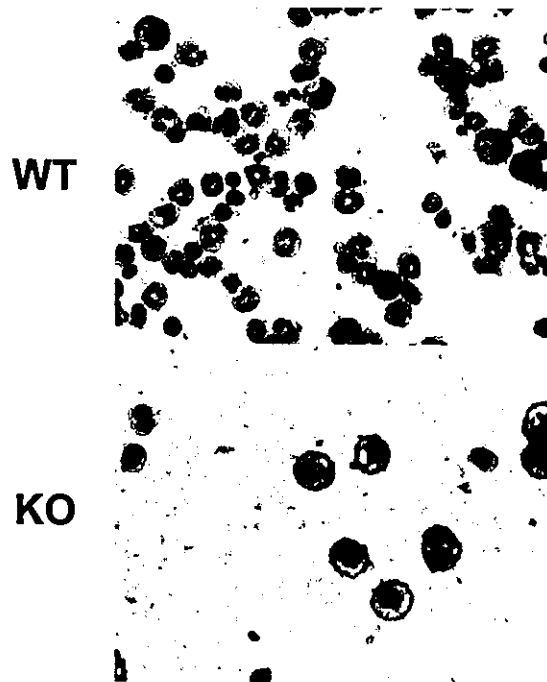


図3 肺胞洗浄液 (BALF) 中の好酸球浸潤

超高感度 ^{31}P -NMR プロープの開発

分担研究者 田之倉 優 （東京大学大学院農学生命科学研究科）

研究協力者：湯本史明、胡芳宇、金森陽子

研究要旨

タンパク質は生体内で極めて重要な役割を果たしているが、実際にそれらの分子が機能を発現している環境すなわち細胞そのものの中などにおいて、標識することなく天然の状態における性質あるいはダイナミクスの解析を可能とする手法は少ない。そこで、本研究では、非侵襲的な分析法である NMR を用い、非破壊的な観測に向けた高感度 ^{31}P -NMR プロープの開発を行い、植物、牛乳、お茶の非破壊分析を行った。

A. 研究目的

タンパク質は、他のタンパク質をはじめ、核酸、脂質、糖など、さまざまな有機分子、無機分子と相互作用しながら、その機能を発現することで生命活動を支えている。しかし、分子が実際に存在する環境すなわち個体や細胞そのものの中での性質あるいは挙動を調べることができる手法は少ない。近年の様々なイメージング法の発展により、ある刺激を加え、それに反応した細胞中の分子の振る舞いを観察することも可能となっているが、これらは“分子そのもの”というわけではなく、比較的大きな分子による修飾あるいは標識に頼ったものである。この点、非破壊的な観測法であり、個体や細胞あるいは様々な分子が混在した溶液から観測したいものの情報だけを原子レベルで得ることが可能な NMR は極めて有用な手法である。また、対象となる分子に修飾を加えることなく、天然の状態で解析することができる点も特長の1つであると言える。

そこで、本研究では、主要な生体構成元素の1つであるリンに注目し、超高感度 ^{31}P -NMR プロ

ープの開発を行い、植物、牛乳、お茶などをそのままの状態で調べることを目的とした。

B. 研究方法

プロープ開発では、“液体窒素による回路および素子の冷却”ならびに“検出コイルの方向を変えることによる巻き数の増加”などの方法が考えられるが本研究では、検出コイルの方向を変えることによる巻き数の増加によって、従来型 ^{31}P -NMR プロープに対して感度の向上を試みた。

また、生理的環境を灌流によって作り出した上で直接モニターするための専用セルの開発も行った。さらに並行して、本プロープでの検出対象となる植物、生体物質の混合物の例として牛乳、お茶について非破壊分析を行った。

C. 研究成果

本研究で開発したプロープを図1(次ページ)に示す。本プロープは、特に、短い横緩和時間に対応できるように、測定用パルス、レシーバーのゲーティング・ダイナミックレンジを重点的に向上で

きるものとなっている。

また、植物の解析においては、水草(オオカナダモ, *Egeria densa*)の葉をそのままセルにつめ、生理的条件下で測定することによって、迅速に、液胞中と細胞質中の無機リン酸を検出することができた(図 2)。これより、液胞内及び細胞内の無機リン酸含有量と pH を、細胞を壊すことなく、生きた状態で、短時間で調べることが可能となった。牛乳の解析においては、1次元 ^{31}P -NMR 測定に加え、2次元 ^1H - ^{31}P NMR 測定法を適用することで、前処理を行うことなく、牛乳中に含まれるリン酸化合物成分について同定することに成功した。また、お茶そのものの NMR 測定により、茶由来ポリフェノール由来シグナルの帰属に成功した。

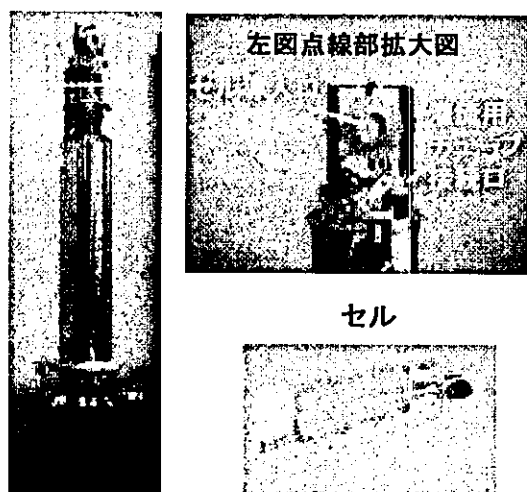


図 1 作製したプローブヘッドとセル

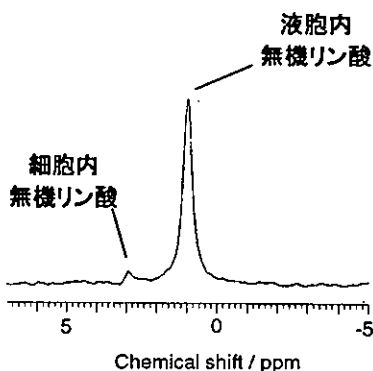


図 2 オオカナダモの ^{31}P -NMR スペクトル

D. 考察

本研究において、 ^{31}P -NMR プローブ、フロー対応型専用セルの開発を行った。また、植物そのものや混合物である牛乳、お茶を非破壊的に分析することができた。さらなる、シグナル検出感度を上げ、S/Nの向上のためには、シム調整のためのコイルの巻き方を検討する必要があると考えられる。

本法を応用することにより、他の植物、混合物についても NMR を用いた非破壊的解析を行うことができると考えられる。

E. 結論

^{31}P -NMR プローブの開発に成功した。これにより、実際に細胞や組織を生きた状態で長時間保持しながら、 ^{31}P -NMR スペクトルを測定することが可能となった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hatano, K., Kojima, M., Tanokura, M. and Takahashi, K. (2003) Nuclear magnetic resonance studies on the pK_a values and interactions of ionizable groups in bromelain inhibitor VI from pineapple stem. *Biol. Chem.* 384, 93-104.

Katayama, H., Nagata, K., Ohira, T., Yumoto, F., Tanokura, M. and Nagasawa, H. (2003) The solution structure of molt-inhibiting hormone from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *J. Biol. Chem.* 278, 9620-9623.

Suzuki, R., Nagata, K., Yumoto, F., Kawakami, M., Nemoto, N., Furutani, M., Adachi, K., Maruyama, T. and Tanokura, M. (2003) Three-dimensional solution structure of an archaeal FKBP with a dual function of